

不同哺乳动物细胞表达尿激酶原的研究

钱 锋 肖成祖 高丽华 张正光 郭智霞 俞炜源

(北京生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 以重组尿激酶原(pro-UK)为研究对象,构建了细胞表达载体,对不同细胞表达载体进行了较为系统的比较性研究。确定了所构建 pro-UK 三种载体的表达特性,成功建立了 pro-UK 哺乳动物细胞表达系统。重组 Namalwa、Vero 和 Sp2/0 细胞表达 pro-UK 的水平分别是 200、12.5 和 50IU/(10^6 cell, 24h)。亲和层析纯化 pro-UK 纯度在 90% 以上。免疫吸附溶酰胺测定表明 CHO 细胞表达 pro-UK 单链比例最低,而 Vero 和 Namalwa 细胞表达 pro-UK 单链比例最高。该研究对生产 pro-UK 时,选择更好的哺乳动物细胞表达系统具有重要的指导意义。

关键词 尿激酶原, Namalwa 细胞, Vero 细胞, Sp2/0 细胞, 蛋白质稳定性

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0349-04

尿激酶原(Prourokinase, 简称 pro-UK)是一类丝氨酸蛋白酶,可以激活体内的纤溶酶原转变成有活性的纤溶酶,从而溶解血栓中的纤维蛋白,因此在溶血栓的治疗方面有着广泛的应用。pro-UK 中 Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹ 间肽键容易被纤溶酶及其他一些酶类水解,生成尿激酶(urokinase, 简称 UK)。UK 由 A 链和 B 链两条肽链组成,靠链间二硫键连接。和 UK 相比,pro-UK 和纤维蛋白的亲合力较高,激活纤溶酶的部位常在血栓形成的部位,因而引起全身出血倾向的副作用要比尿激酶小,是一种更优越的纤溶酶原激活剂^[1]。Pro-UK 和 UK 之间往往只有一个多肽键的差异,两者在分子表面特性、抗原性以及分子量方面非常相似,常规层析方法难以分离,pro-UK 下游纯化非常困难。

最常用于表达外源基因的哺乳动物细胞是 CHO 二氢叶酸还原酶(dhfr⁻)的 CHO 细胞可使外源基因在 MTX 压力下基因拷贝数扩增,外源蛋白质得到较高水平表达^[2]。但随着研究的深入,人们发现 CHO 细胞作为宿主细胞有着某些缺点。Satoh 等比较了 CHO 细胞和人淋巴瘤 Namalwa 细胞表达的 pro-UK 的稳定性。CHO 表达的 pro-UK 被该细胞分泌的半胱氨酸类内肽酶降解成双链尿激酶。相反, Namalwa 细胞表达的 pro-UK 没有出现降解,提示不同系统表达的重组蛋白的稳定性可能取决于不同宿主细胞^[3]。故本文拟选用 Namalwa、Vero、

Sp2/0 等细胞作为宿主细胞,以 pro-UK 为对象,研究它在不同细胞中表达的特性,希望通过研究筛选出新的更好的生产 pro-UK 的宿主细胞。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和细胞株

大肠杆菌 DH5 α , 非洲绿猴肾细胞 Vero, 表达 pro-UK 的 CHO 细胞和鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 为本室保存。真核表达载体 pcDNA₃LacZ 由北京医科大学汤健教授惠赠。质粒 pUK、pU3、pSV2dhfr 等由本所俞炜源教授提供, pSV2neo 购自 Clontech 公司。人 B 淋巴瘤 Namalwa 细胞由中国科学院上海细胞生物研究所惠赠。来源于非洲绿猴肾的 Cos-7 细胞由本院王海涛教授惠赠。

1.2 质粒 DNA 操作

限制酶及 DNA 连接酶、Klenow 大片段酶等分别购自 Promage 公司及中国华美生物工程公司。质粒 DNA 的酶切、连接和转化等操作参照文献^[4]有关章节进行。用碱变性法^[4]抽提 DNA, 参照生产商所述方法用阴离子交换层析柱 QIAGEN[®]-Tip20 纯化 DNA。或者用聚乙二醇法^[4]纯化 DNA。

1.3 细胞转染及克隆筛选

用一定剂量的酶切线性化的质粒电穿孔法^[5]转染 Vero、Sp2/0 和 Namalwa 细胞。即将(2~5) $\times 10^7$ 细胞悬浮于 0.5mL cytomix 缓冲液(120mmol/L

KCl, 0.15mmol/L CaCl₂, 10mmol/L K₂HPO₄, pH7.6, 25mmol/L HEPES, pH7.6, 2mmol/L EGTA, pH7.6, 5mmol/L MgCl₂, 2mmol/L ATP, 5mmol/L 谷胱甘肽), 于 Bio-Rad Gene Pulser II 电击仪 0.2cm 间距电击槽 300V, 1000 μ F 条件下进行电击。细胞重悬于 10mL 完全培养基 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 孵箱培养 48h 后, 换含一定浓度的 G418 培养基, 分种细胞于 96 孔细胞培养板进行筛选。15d 左右细胞克隆出现, 取细胞上清测 pro-UK 活性, 挑有活性细胞克隆有限稀释法纯化。Vero 细胞采用脂质体法和电穿孔法转染细胞, 脂质体法根据生产商所述方法进行。

1.4 pro-UK 活性测定

采用改进的纤维蛋白平板法(FAPA)^[6]进行测定。

1.5 MTX 加压实验

采用文献 7 所述方法并加以修改。

1.6 Western blotting 实验

分别取 Sp2/0 细胞和 Namalwa 细胞培养上清, 与等体积还原或非还原上样缓冲液混合, SDS-PAGE 每孔上样 20 μ L, 电泳完毕后, 将蛋白带半干电转移至硝酸纤维素滤膜, 用自制兔抗人 pro-UK 多抗血清作为一抗, 二抗采用本院五所生产的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, Western blotting 检测 pro-UK 的表达^[4]。

1.7 pro-UK 纯化

用抗 pro-UK 单克隆抗体亲和层析法纯化细胞培养上清中的 pro-UK^[8]。

1.8 免疫吸附溶酰胺检测(IAA)

按文献 9 方法进行。

2 结 果

2.1 pro-UK 真核表达载体的构建

为了实现 pro-UK 基因在真核细胞中的表达, 构建了真核表达载体。真核表达载体 pcDNA₃UK 具有以下特点: 人巨细胞病毒早期启动子(P CMV) 和增强子调控 pro-UK 的高效表达; neo 基因作为阳性筛选标记; 生长激素基因的加 polyA 和转录终止信号增加了 mRNA 的稳定性。

考虑到不同哺乳动物细胞可能需要不同增强子和启动子以获得外源基因的有效表达, 为了增加 pro-UK 在真核细胞中表达的机会, 实验中还选用了不同的表达质粒。现将所用质粒单一内切酶和各自调控成分及筛选标记列于表 1。

表 1 试验用表达质粒特性

Table 1 The properties of plasmids used in this study

	Mono-restriction site	Gene expressed	promotor	Selection gene	3' sequence
pcDNA ₃ UK	<i>PvuI</i>	pro-UK	CMV P	<i>neo</i>	BGHpA0
pUK	<i>SalI</i>	pro-UK	MTpro	<i>dhfr</i>	SV40pA
pU ₃	<i>PvuI</i>	pro-UK	Adv MLP	<i>dhfr</i>	SV40pA
pSV2neo	<i>EcoRI</i>	<i>neo</i>	SV40	<i>neo</i>	SV40pA
pSV2dhfr	<i>EcoRI</i>	<i>dhfr</i>	SV40	<i>dhfr</i>	SV40pA

2.2 不同细胞表达 pro-UK 的水平

3 种表达质粒在 3 种细胞系中的表达水平见表 2。不同宿主细胞表达 pro-UK 水平高低依次是 Sp2/0 > Namalwa > Vero 细胞。以质粒 pcDNA₃UK 为例, Sp2/0 转化子表达 pro-UK 水平最高是 50 IU/(10⁶ cells, 24h), Namalwa 转化子表达 pro-UK 水平最高是 7IU/(10⁶ cells, 24h), Vero 转化子表达 pro-UK 水平最高是 1IU/(10⁶ cells, 24h), 提示 Sp2/0 细胞可能较适合外源基因的表达, 而 Vero 细胞最不适合。

表 2 不同质粒在不同细胞稳定表达 pro-UK cDNA 的表达水平 IU/(10⁶ cells, 24h)

Table 2 Stable expression of pro-UK with 3 plasmids in various cell lines [IU/(10⁶ cells, 24h)]

Plasmid	Promotor	Vero	Sp2/0	Namalwa
pcDNA ₃ UK	hCMVP	1	25(50)	7
pUK	MT Pro	1.25	n. d.	(30)
pU ₃	Adv MLP	1(1.25)	10	n. d.

Note: n. d. stable cell clone was not found; the figures in parentheses show the pro-UK expression level obtained by large DNA dosage electroporation methods as mentioned in Material and Methods.

2.3 MTX 加压实验

细胞经过转染、筛选, 得到表达 pro-UK 的细胞株后, 用浓度逐渐增高的 MTX 对其进行加压筛选, 以便 pro-UK 基因的扩增, 增加 pro-UK 的表达水平(表 3)。

表 3 不同 MTX (nmol/L) 浓度下重组细胞表达 pro-UK 的水平 IU/(10⁶ cells, 24h)

Table 3 Pro-UK expression levels in various cells with different MTX concentrations [IU/(10⁶ cells 24h)]

	0nmol/L	50nmol/L	500nmol/L	5000nmol/L
Vero	5		12.5	
Sp2/0	10	20		
Namalwa	30		100	200

由上表可知,3种重组细胞中,pro-UK 表达水平从高到低依次是 Namalwa[200IU/(10⁶ cells, 24h)],Sp2/0[20IU/(10⁶ cells, 24h)],Vero 细胞[1.25IU/(10⁶ cells, 24h)]

2.4 Western blotting 检测 pro-UK 的表达

实验中发现,因 Vero 细胞 pro-UK 表达量太低,其最高表达水平在 500nmol/L MTX 浓度下仅为 12.5 IU/(10⁶ cells, 24h),Western blotting 不能检测到 pro-UK 在 Vero 细胞中的表达。图 1 表示在 Sp2/0 细胞和 Namalwa 细胞中都可检测到 pro-UK 的特异性条带,而且表达产物主要是高分子单链 pro-UK。

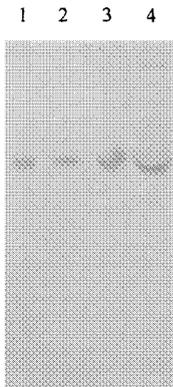


图 1 Western blotting 检测 pro-UK 在 Sp2/0 细胞和 Namalwa 细胞中的表达

Fig. 1 Western blotting assay showed the expression of pro-UK in Sp2/0 cells and in Namalwa cells

1. pro-UK from Sp2/0 cells, deoxidized;
2. pro-UK from Namalwa cells, deoxidized;
3. pro-UK from Sp2/0 cells, non-deoxidized;
4. pro-UK from Namalwa cells, non-deoxidized

2.5 细胞株稳定性实验

1次传代后,对重组细胞持续分泌 pro-UK 能力的跟踪分析结果表明,重组 Namalwa 细胞能持续稳定分泌 pro-UK(图 2),这表明扩增后的 pro-UK 基

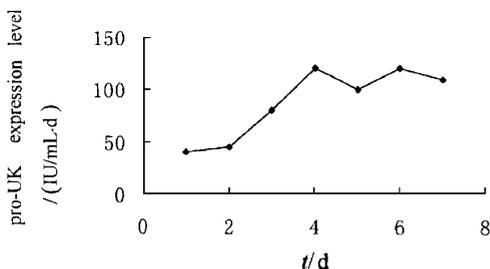


图 2 重组 Namalwa 细胞一次传代后分泌 pro-UK 的持续稳定潜力实验

Fig. 2 Stable expression of pro-UK in recombinant Namalwa cells after cell division

因可能已稳定整合进染色体。

2.6 pro-UK 的纯化

重组细胞扩大培养至 1000mL 转瓶中,收集细胞培养上清,-20℃ 保存备用。

亲和层析法纯化 pro-UK。细胞培养上清最大上样量为 8L。SDS-PAGE 扫描结果表明,还原条件下 pro-UK 纯度在 90% 以上。电泳图见图 3。

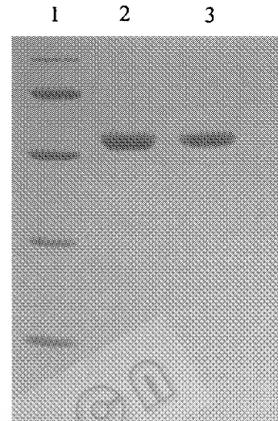


图 3 纯化自重组 Sp2/0 细胞和 Namalwa 细胞表达的 pro-UK SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE of pro-UK purified from recombinant Sp2/0 and Namalwa cells

1. Protein MW marker 97400 66200 42700 31000 14400;
2. pro-UK purified from Sp2/0 cells;
3. pro-UK purified from Namalwa cells

2.7 pro-UK 的溶酶体活性

天然 pro-UK 作为 UK 的前体形式,只有极低的溶酶体活性,只有当它被 Plasmin 分解为 UK 后,才具有对小分子底物 S-2444 的溶酶体活性。而 UK 却具有相当的溶酶体活性^[10]。我们表达的重组 pro-UK 和天然的 pro-UK 有相同的性质。它本身只有极低的溶酶体活性(直接溶酶体活性),在被 Plasmin 分解为双链之后,其溶酶体活性得到了提高。

2.8 pro-UK 的分子量

用 SDS-PAGE 方法测定。浓缩胶和分离胶浓度分别为 4.5% 和 10%,还原条件下进行,用考马斯亮蓝 G250 染色,分子量标准为 94,67,43,33 和 17.5kD。电泳后对凝胶进行扫描,计算各蛋白的相对迁移率,定出 pro-UK 的分子量约为 52kD,这和报道的天然 pro-UK 的分子量接近^[11]。

2.9 IAA 法测定各重组细胞表达 pro-UK 单双链比例

用 IAA 法分别测定了重组 CHO,Vero,Sp2/0 和 Namalwa 细胞表达尿激酶单双链比例,共测定 4

种细胞培养上清 3 批次, 每批样品重复测定 3 次。4 种细胞培养上清中尿激酶原单链比例分别是 CHO 47.2%, Sp2/0 74.0%, Namalwa 85.5%, Vero 92.4%。

4 讨 论

不同宿主细胞对产品审批和细胞大规模培养工艺会产生不同的影响, 也会产生不同的蛋白质糖基化类型。Namalwa 细胞是从患有 Burkitt 淋巴瘤的同名病人获得的一株人的类淋巴母细胞。该细胞曾被大规模用于生产 α 干扰素^[12]。Namalwa 细胞表达的 pro-UK 没有出现降解^[3]。Vero 细胞是于 1962 年从正常的成年非洲猴肾获得的。可支持多种病毒的增殖, 它已被准许用于人体。WHO 建议使用 Vero 细胞生产脊髓灰质炎疫苗, 以避免使用大量的猴子^[13]。选择 Sp2/0 细胞是因为该细胞能高效表达外源基因^[14]。

pro-UK 作为酶原形式很容易被一些蛋白酶降解, 使其变成双链 UK。为了提高 pro-UK 的得率, 主要采取向培养基中加 aprotinin 来抑制 pro-UK 的分解^[11], 这样不仅增加了培养成本, 而且 pro-UK 的分解并不能完全避免。Sato 等^[3]在酶抑制实验中发现, Aprotinin 的抑制效率只有 60% 左右, 同时他们发现, pro-UK 的分解还和表达系统有关, 在 CHO 细胞中表达的 pro-UK, 其单链比例小于在 Namalwa 细胞中表达的 pro-UK 的比例, 他们认为 CHO 细胞中的内肽酶是起主要作用的酶。本研究用 IAA 法分别测定 4 种细胞培养上清中尿激酶原单链比例分别是, CHO 47.2%, Sp2/0 74.0%, Namalwa 85.5%, Vero 92.4%。表明在培养基不加任何蛋白酶抑制剂的情况下, CHO 细胞获得 pro-UK 比率最低, pro-UK 分解为 UK 最严重, 而 Vero 细胞和 Namalwa 细胞 pro-UK 得率较高, 表明这两种细胞有利于 pro-UK 的稳定。

参 考 文 献

- [1] Holmes W E, Pennica D, Blaber M *et al.* *Bio/Technol*, 1985, **3**: 923~929
- [2] Kaufman R J, Wasley L C, Spiliotes A J *et al.* *Mol Cell Biol*, 1985, **5**: 1750~1759
- [3] Sato M, Hosoi S, Miyaji H *et al.* *Cytotechnology*, 1993, **13**: 79~88
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989
- [5] Van den Hoff M J B, Labrayere W T, Moorman A F M *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1990, **18**: 6464~6467
- [6] 高丽华, 肖成祖, 张正光等, *生物技术通讯*, 1992, **3**: 94~96
- [7] Miyaji H, Harada N, Mizukami T *et al.* *Cytotechnology*, 1990, **4**: 39~43
- [8] 高丽华, 肖成祖, 张正光等, *生物技术通报*, 1999, **15**: 43~45
- [9] Corti A, Luisa M N, Cassani G *et al.* *Thromb Haemostas*, 1986, **56**: 407~410
- [10] Stump D C, Thienpont M, Collen D. *J Biol Chem*, 1986, **261**: 1267~1273
- [11] Kasai S, Arimura H, Nishida M *et al.* *J Biol Chem*, 1985, **260**: 12377~12388
- [12] Finter N B, Ball G D, Fantes K H *et al.* *Symp Quant Bilo*, 1986, **51**: 571~575
- [13] Milstien J, Grachev V, Padilla A *et al.* *Dev Biol Stand*, 1996, **86**: 31~39
- [14] Traunecker A, Oliveri F, Karjalainen K, *Trends Biotechnol*, 1991, **9**(4): 109~113

Expression of Prourokinase in Different Mammalian Cells

QIAN Feng XIAO Cheng-Zu GAO Li-Hua ZHANG Zheng-Guang GUO Zhi-Xia YU Wei-Yuan
(Institute of Biotechnology, Beijing 100071)

Abstract Comparison studies of recombinant prourokinase (pro-UK) in various host cells, and expression vectors were carried out. Expression levels of vectors constructed in this study in different cell lines were compared. Mammalian cells expressing pro-UK were established. The levels of pro-UK expression in recombinant Namalwa, Vero and Sp2/0 cells are 200, 12.5 and 50 IU/(10^6 cells 24h), pro-UK purities separated by immunoaffinity chromatograph are above 90%. Immunoabsorbent assay showed the ratio of pro-UK in CHO cells is lower than that from Vero and Namalwa cells. This study provide new host cells for pro-UK production.

Key words Prourokinase, Namalwa cells, Vero cells, Sp2/0 cells, stability of protein